

**Purificn. of highly acidified oil to obtain triglyceride(s) - by preparing substrate of highly acidified oil and glycerine, contacting with immobilised lipase and dehydrating soln.**

**Patent Number : JP04183396**

**• Abstract :**

JP04183396 A Purificn. comprises prepg. a substrate composed of highly acidified oil and glycerine having 5-20wt.% of the free fatty acids contained in the oil and contacting it with immobilised lipase, while dehydrating the reaction soln., so that the hydrating speed exceeds the decreasing speed of the fatty acids.

The high acidified oil has pref. been degummed and dewaxed. The substrate contg. 50-8,000 ppm water and the immobilised lipase, obtd. by allowing anion exchange resin to adsorb lipase belonging to Mucor and contg. 8.3wt.% water, are allowed to react on each other at 50 deg.C. It is circulated through a loop obtd. by connecting a fixed bed reactor including the immobilised lipase with a dehydrator.

USE/ADVANTAGE - Triglycerides are obtd. efficiently from highly acidified oil from which the amt. of free fatty acids are decreased. (Dwg.0/4)

International patents classification : C12P-007/64 C11C-003/06

**• Publication data :**

Patent Family : JP04183396 A 19920630 DW1992-32 C12P-007/64 14p \* AP: 1990JP-0307214 19901115

JP95024589 B2 19950322 DW1995-16 C12P-007/64 11p FD:  
Based on JP4183396 AP: 1990JP-0307214 19901115

Priority n° : 1990JP-0307214 19901115

Covered countries : 1

Publications count : 2

**• Patentee & Inventor(s) :**

Patent assignee : (AGEN) AGENCY OF IND SCI & TECHNOLOGY  
(BOSO-) BOSO YUSHI KK

**• Accession codes :**

Accession N° : 1992-265592 [32]

Sec. Acc. n° CPl : C1992-118587

**• Derwent codes :**

Manual code : CPI: D05-A01B3 D10-A02

Derwent Classes : D16 D23

**• Update codes :**

Basic update code : 1992-32

Equiv. update code : 1995-16

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑩ 公開特許公報(A) 平4-183396

⑤ Int. Cl.<sup>3</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑥ 公開 平成4年(1992)6月30日

C 12 P 7/64  
// C 11 C 3/06

8114-4B  
2115-4H

審査請求 有 請求項の数 12 (全14頁)

④ 発明の名称 高酸価油の精製法

⑧ 特 願 平2-307214

⑨ 出 願 平2(1990)11月15日

特許法第30条第1項適用 平成2年10月3日、東北大学薬学部内 第29回油化学討論会・研究発表会実行委員会発行の「講演要旨集」に発表

⑦ 発 明 者 小 杉 佳 次 茨城県つくば市東1丁目1番3号 工業技術院微生物工業技術研究所内

⑦ 発 明 者 白 木 勝 茨城県つくば市東1丁目1番3号 工業技術院微生物工業技術研究所内

⑩ 出 願 人 工業技術院長 東京都千代田区霞が関1丁目3番1号

⑩ 復 代 理 人 弁理士 北村 和男

⑩ 出 願 人 ボーソー油脂株式会社 東京都中央区日本橋本町1丁目1番地

⑩ 代 理 人 弁理士 北村 和男

最終頁に続く

明 細 書

1 発 明 の 名 称

高酸価油の精製法

2 特 許 請 求 の 願 望

1. 高酸価油と該高酸価油中の遊離脂肪酸含量の約5~20wt.%のグリセリンとから成る蒸気を調製し、該蒸気と固定化リパーゼとの接触反応とその反応液の脱水処理とを同時に行い、且つその脱水速度を脂肪酸の減少速度より大きくすることを特徴とする高酸価油の精製法。

2. 該固定化リパーゼの初期含水量は、1.3~8.3%であり、該蒸気の初期水分濃度は、約50~8000 ppmであり、反応温度は50℃以上である請求項1の高酸価油の精製法。

3. 該固定化リパーゼは、ムコール属のリパーゼを陰イオン交換樹脂に結合させたものである請求項1の高酸価油の精製法。

4. 該高酸価油は、製ガム、脱ロウした高酸価油である請求項1又は2の高酸価油の精製法。

5. 該脱水速度が脂肪酸の減少速度の100.1%以上になるように脱水し乍ら反応液を固定化リパーゼに繰り返し接触させるようにした請求項1の高酸価油の精製法。

6. 適時、水分濃度約50~8000 ppmの蒸気を添加することを特徴とする請求項1の高酸価油の精製法。

7. 該固定化リパーゼを内蔵した固定床リアクターと脱水装置とを各別に設けると共に、これらをループ状に連結し、該蒸気を循環させ接触反応条件と脱水条件とを各別に調整し得るようにし、脱水速度が脂肪酸の減少速度よりも大きい値を所望に調整し得るようにしたことを特徴とする請求項1の高酸価油の精製法。

8. 該固定化リパーゼを内蔵した固定床リアクターとエバポレーション式脱水装置と循環槽と循環用ポンプとをループ状に連結して高酸価油の精製装置を用い、該蒸気の循環下で、該固定床リアクターでの反応温度を50~70℃に保ち、接触反応を繰り返すと同時に、該脱水

特開平4-183396(2)

装置で60℃以上で加熱蒸発による脱水処理を繰り返すことを特徴とする請求項6の高酸価油の精製法。

9. 該固定化リパーゼを内蔵した固定床リアクターと、バブリング式脱水装置と循環用ポンプとをループ状に連結した反応系と、不活性ガス供給源に連なるモレキュラーシーブカラムと循環用エアポンプと該脱水装置とをループ状に連結した脱水系とから成る高酸価油の精製装置を用い、該装置の循環下で該固定床リアクターでの反応温度を50～70℃に保ち、接触反応を繰り返すと同時に該脱水装置に乾燥不活性ガスを降圧に保ち乍らバブリング脱水を繰り返すようにしたことを特徴とする高酸価油の精製法。

10. 請求項1、7、8又は9の高酸価油の精製法において、適時、溶剤を循環させることを特徴とする高酸価油の精製法。

11. 請求項1、7、8又は9の高酸価油の精製法において、適時、還元剤を循環させることを

特徴とする高酸価油の精製法。

12. 請求項1、7、8又は9の高酸価油の精製法において、反応系内での酸素濃度を大気中の酸素濃度の1.5%以下にすることを特徴とする高酸価油の精製法。

3 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は、高酸価油から遊離脂肪酸を減少させると共に、トリグリセリドを高収率で得る高酸価油の精製法に関する。

〔従来の技術〕

従来、脱ガム、脱ロウした高酸価米糠油の精製法として、フラスコ実験により、単に該高酸価米糠油に遊離脂肪酸を除去する化学量論量のグリセリンを添加し、これに水分含量10%のリパーゼを作用させることが報告されている。

(S. Bhattacharyya等 JAOCs, Vol. 66, no. 12 December 1989)。

又、出願人は、先に、高酸価油、グリセリン及び固定化リパーゼを含む反応液を用いて水分

含量3.0重量%以下にて反応させることを特徴とするモノグリセリド高含有物の製造法を提供した。(特公昭62-51593公報)。

〔発明が解決しようとする課題〕

上記従来の高酸価油の精製法は、いずれも、該高酸価油とグリセリンとから成る基質に固定化リパーゼを接触反応させて、遊離脂肪酸を減少せしめグリセリドの増産を行うエステル化反応を連続的に進める方法は全く教示していない。

本発明は、かかる高酸価油とグリセリンとから成る基質に固定化リパーゼを接触反応させる式の高酸価油の精製法において、該基質のエステル化反応を連続的に進め得て工業生産に適した高酸価油の精製法を提供することを目的とするものである。

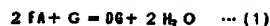
更に、本発明は、遊離脂肪酸及びジグリセリドの含有量が減少し且つ特にトリグリセリド含有量の増大した精製品を得る高酸価油の精製法を提供することを目的とするものである。

〔課題を解決するための手段〕

本発明は、上記の従来法を改善し、且つ上記の目的を達成した連続的にエステル化反応を行うことができる高酸価油の精製法を提供するもので、高酸価油と該高酸価油中の遊離脂肪酸含量の約5～20wt.%のグリセリンとから成る基質を調整し、該基質と固定化リパーゼとの接触反応とその反応液の脱水処理とを同時に行い、且つその脱水速度を脂肪酸の減少速度より大きくすることを特徴とする。

〔作用〕

上記の基質は、該固定化リパーゼとの接触により主に下記の反応が主として行われる。



この際、同時に行われる脱水処理が進行し、特に、その脱水速度を遊離脂肪酸(FA)の減少速度より大きくするようにしたので、上記(1)(2)の反応は右側に行進し、即ち、エステル化反応は促進され、経時的に遊離脂肪酸の減少とこれに伴うトリグリセリド(TG)の増大が進み、最終

特開平4-183396(8)

的に、脂肪酸の大部分がトリグリセリドに合成された精製品の円滑な生産が得られる。

この反応過程で進行するため、ジグリセリド(OG)は、初期に急速に合成され、その後は減少し続け、それに伴いトリグリセリドが増加する。又、モノグリセリド(MG)は殆ど合成されなかった。

該固定化リパーゼとしては、初期含水量 1.3 ~ 8.3 % のもの及び該基質として初期水分濃度約 50 ~ 8000 ppm のものを使用し、反応温度 50℃ 以上で反応させるときは、これ以上の水を含有する固定化リパーゼと基質を使用するに比し、トリグリセリドの合成量が增大する。

又、固定化リパーゼとしては、特に、ムコール属のリパーゼを陰イオン交換樹脂に固定したものを使用するときは、微水系にて優れた活性を示し好ましい。

該高酸価油としては、脱ガム、脱ロウした高酸価油を使用するときは、固定化リパーゼが、ガム、ロウに被覆されず、長期の使用ができ、

また反応系にガム、ロウの詰まりが起こらず好ましい。

該脱水速度と脂肪酸の減少速度との関係に特に着目した所、前者の速度が後者の速度の 100.1% 以上になるように保持することにより、確実に脂肪酸を減少させる反面、トリグリセリドの合成を行うことができる。

更に、上記の本発明の精製法を行う過程で、適時水分濃度約 50 ~ 8000 ppm の基質を添加することにより、本法による連続して精製品が得られ、大量生産が可能となる。

更に、本発明の実施態様として、該固定化リパーゼを内蔵した固定床リアクターと脱水装置とを各別に設けると共に、これらをループ状に連結し、該基質を循環させ接触反応条件と脱水条件とを各別に調整し得るようにし、脱水速度が脂肪酸の減少速度よりも大きい値を所望に調節し得るようにするときは、高酸価油の種類、反応過程の状況の変化に応じて、接触反応条件、脱水条件を各別に自由に調整でき、目的とする

トリグリセリド高含有の精製品を得られ有利である。

上記の実施態様の更に具体的な方法として、該固定化リパーゼを内蔵した固定床リアクターとエバポレーション式脱水装置と恒溫槽と循環用ポンプとをループ状に連結して高酸価油の精製装置を用い、該基質の循環下で、該固定床リアクターでの反応温度を 50 ~ 70℃ に保ち、接触反応を繰り返すと同時に、該脱水装置で 60℃ 以上で加熱蒸発による脱水処理を繰り返すようにするときは、確実にトリグリセリド高含有の精製品が得られる。

更に、他の具体的な方法として、該固定化リパーゼを内蔵した固定床リアクターと、バブリング式脱水装置と循環用ポンプとをループ状に連結した反応系と、不活性ガス供給源に連なるモレキュラーシーブカラムと循環用エアポンプと該脱水装置とをループ状に連結した脱水系とから成る高酸価油の精製装置を用い、該基質の循環下で該固定床リアクターでの反応温度を 50

~ 70℃ に保ち、接触反応を繰り返すと同時に該脱水装置に 60℃ 以上で乾燥不活性ガスを隔圧に保ち乍らバブリング脱水を繰り返すようにするときは、確実にトリグリセリド高含有の精製品が得られる。

更に、本発明の上記精製法の実施において、適時溶剤を循環すれば、固定化リパーゼの細孔内流路の付着物が除かれ、その活性を内上できる。

又、適時、還元剤を循環することにより、その活性が向上し、トリグリセリドの収量が向上する。

又、反応系路内の酸素濃度を大気中の酸素濃度の 1.5% 以下とすることにより、生産物の過酸化物質上昇を防止できる。

〔実施例〕

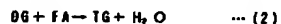
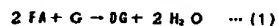
次に本発明の高酸価油の精製法につき詳述する。

高酸価油とは、遊離脂肪酸が約 15% 以上含まれた油を指し、高酸価の米糠油やパーム油な

特開平4-183396 (4)

どが本発明の対象である。米糠油は、コレステロールを低下させる効果が強く、健康食品として注目されているが、アジアでは米生産量が多いにも拘らず、精製方法が遅れているため、多くの国の米糠油は、遊離脂肪酸を多く含み、食用に適さない高酸価油に変成してしまう。この現状に鑑み、本願の発明者は、高酸価油から食用油収量を増大させることを目的とし、固定化リパーゼによる回分式精製について研究してきたが、今般、該高酸価油に含有する遊離脂肪酸を効率よく減少させ、高収率にトリグリセリドに合成された精製法の要件の1つは、高酸価油の遊離脂肪酸の含有量の約5~20wt.%のグリセリンを添加配合した高質を用いることである。

更に、該高質を用い、これに固定化リパーゼを接触反応させると同時に、その反応液に脱水処理を施すことにより、効率よく下記2段の反応式のエステル化反応が進行酸化する。



としては、その初期含水量が1.3~8.3%のものが好ましく、その中でも、2~4%が推奨され、特に、1.3%以下になると活性発現に支障を来す傾向が見られた。該高質としては、その初期水分濃度が100~7000ppmが好ましく、その中でも500~2000ppmが推奨され、500ppmとなると、脂肪酸の減少速度が低下する傾向があり、8000ppmとなると、トリグリセリドの収量が低下する傾向がある。

尚、反応温度は、50~70℃が好ましく、この範囲内では、固定化リパーゼの熱失活は起こらず、又、雑菌の汚染もなく、高い反応速度を維持できる。又、反応中、飽和脂肪酸のような高融点成分の析出もない。

該高酸価油としては、脱ガム、脱ロウしたものをを用いることが好ましい。脱ガム、脱ロウすることにより、固定化リパーゼ担体内部への反応物質の移動速度を高く保ち、固定化リパーゼ活性を充分活用でき、又、固定化リパーゼを充填した固定床リアクター内部の圧力損失を低く

茲で、FAは脂肪酸、Gはグリセリン、DGはジグリセリド、TGはトリグリセリドの略称である。

この場合、発明者は、エステル化反応工程において、特に、脂肪酸の減少速度と脱水速度との関係に注目し、検討した結果、脱水速度は、脂肪酸の減少速度より大きく、即ち、100.1%以上に維持することが重要であることを知見した。更に具体的には、単位時間当たりの脱水モル数 $(\Delta v / \Delta t)$ と単位時間当たりの脂肪酸減少モル数 $(\Delta FA / \Delta t)$ との間には、 $(\Delta v / \Delta t) = K (\Delta FA / \Delta t)$ の関係があり、トリグリセリドを高収率で得るためには、Kは1.001以上の定数である必要があることを知見した。

この場合、反応液中の水分濃度が450ppm以下にまで脱水し、脱水系下に保持することがトリグリセリドの高収率を得るために好ましい。この条件を満足するには、高温による蒸発乾燥、減圧による方法、或いは乾燥不活性ガスの通気などによる方法が用いられる。

尚又、この場合に使用される固定化リパーゼ

保つことができ、更には、精製装置の高酸価油のループ、即ち、循環パイプなどの目詰りを防止できる。脱ガムは、原油に3~5%の熱水(70~100℃)を加え、水と析出したガム質を遠心分離等で除去する水和脱ガム等により達成される。脱ロウは、原油を約85℃に加熱後、長時間かけて冷やし、ヘキサンを加えてミセルとし、浮遊助剤を加えてワックス分を浮遊して除去することにより達成される。又、室温にてヘキサンを抽出した低溫抽出油を用いれば、脱ロウを行わなくても使用できる。

該固定化リパーゼとしては、クロモバクテリウム属のリパーゼ、シュウドモナス属のリパーゼやリゾブス属のリパーゼ、ムコール属のリパーゼなどがあり、水分1%以下とした場合は、特に、ムコール属のリパーゼが酸価を減少を続けることができ、脱水系において活性を維持することができ、本法に使用するに最適である。而して、これを陰イオン交換樹脂に固定化し、リアクター内に充填し使用することが好ましい。

陰イオン交換樹脂はデオライトES 562或いは  
 グラウエックスHWA-1のようなマクロポーラスな  
 弱塩基性陰イオン交換樹脂が好ましい。リパー  
 ーゼは、ムコール・ミーハイ或いはムコール・ジ  
 ャバニカスのリパーゼが上げられるが、熱安定  
 性の点からは前者の方が望ましい。ムコール属  
 のリパーゼを陰イオン交換体に固定化したリパ  
 ーゼは、反応液の水分濃度が10 ppm以下の超微  
 水系環境でも反応することができる。しかし超  
 微水系環境においては固定化リパーゼが不安定  
 になる場合があるので、安定化処理をした固定  
 化リパーゼを用いることにより、長期に亘り精  
 製処理を続けることができ、又、本発明の効果  
 は更に向上する。

ムコール属のリパーゼは、グリセリドの1、  
 3位のアシル基に強い親和性を有し、グリセリ  
 ドの2位のアシル基への転移は、非酵素的にも  
 進行するが、シュウドモナス属細菌のようなグ  
 リセリドの2位にも特異性を有する固定化リパ  
 ーゼを併用することにより本発明の効果は更に

増大する。

更に本発明の精製法によれば、所望に応じ、  
 連続的に行うには、適時、水分濃度 100~7000  
 ppmの基質を添加することが好ましい。かくし  
 て、添加された基質に対し引き続き本発明の高  
 酸価油の精製が行われる。この場合、水分濃度  
 の高い基質を添加すると、固定化リパーゼへの  
 水分補給を行うことができ、その活性を向上せ  
 しめることができる。かくして、精製品の品質  
 の低下防止、固定化リパーゼの失活防止、活性  
 の向上などの諸効果をもたらす。

又、本発明による精製法において、適時、溶  
 剤を循環することが好ましい。即ち、前記の脱  
 ガム、脱ロウした高酸価油を用いても、微量に  
 含有していたガム、ロウが蓄積し、長時間連続  
 運転をしていると精製装置の例えば循環ポンプ  
 の送液圧力が上昇したり、固定化リパーゼ活性  
 が低下する場合がある。このような時には、50  
 ~70℃の有機溶媒を適当な時間循環せしめ、固  
 定化リパーゼ及び配管系統を洗浄することが好

ましく、その洗浄後、再び反応を継続させる。  
 かゝる手段により固定化リパーゼの細孔内に詰  
 っていた付着物を取り除き、活性度を保持させ  
 ると共に、配管や固定床内の付着物も除け、循  
 環ポンプの送液圧を減少させることができる。  
 有機溶媒としては、ヘキサン、アセトン、イソ  
 オクタンなど各種の適当な溶媒が使用できる。

米糠油等は、不飽和脂肪酸を80%以上含有す  
 るので、反応系内の酸素濃度が高いと、過酸化  
 物の上昇傾向がある。又、密閉したループ式  
 の精製装置でも長期に亘り連続していると、そ  
 の反応系内の酸素濃度が増大し、生産物を酸  
 化し、過酸化物を生成し、品質を低下し、又、  
 固定化リパーゼの失活をもたらす機がある。

又、本発明によれば、これをかゝる不都合を  
 予防し或いは改善するため、その1つの手段は、  
 還元剤を適時循環する。これにより固定化リパ  
 ーゼの失活を防止でき、又、その活性を改善で  
 きる。

該還元剤としては、マニトール、ソルビトール

等の糖アルコール、糖、アスコルビン酸、ス  
 パーオキシドデスモターゼ等が上げられる。緩  
 衝液中に還元剤を添加した液として、リアクタ  
 ー等に添加する。

他の手段としては、ループ状の反応系内を  
 乾燥した窒素ガス等の不活性ガスで陽圧に保持  
 し、或いは反応系内を真空脱気して反応系内  
 の酸素濃度を大気中の酸素濃度の1.5%以下と  
 することである。陽圧手段としては、例えば、  
 反応系内を不活性ガスを数分間バブリングし、  
 これにより不活性ガスを飽和状態にした後、更  
 に反応系内に導入し、該系内を不活性ガス圧力  
 が大気圧より高くなるように保持することであ  
 る。

本発明の高酸価油の精製法について更に詳述  
 する。

該固定化リパーゼによるグリセリド合成にお  
 いては、モノグリセリドの抽出は僅かであった。  
 反応液中の高酸価油に対するグリセリンの量を  
 増加させると反応終了後の脂肪酸に対するトリ

特開平4-183396(8)

グリセリドの割合TG/FAは増加した。一方ジグリセリドに対するトリグリセリドの割合TG/DGは減少した。高酸価油を精製するためには、脂肪酸を減少させると共に、ジグリセリドもトリグリセリドにして減少させなければならない。上記の規定より検討し、結局、グリセリン含量を高酸価油中の遊離脂肪酸含量の5~20%にして固定化リパーゼと高酸価油を反応させることにより、脂肪酸及びジグリセリドを減少させ、トリグリセリドを増産させることができる。

次に、本発明を更に具体的な実施例に基づいて説明する。

実施例1

高酸価油として、高酸価米糠油1gを用いた。該米糠油は、トリグリセリド(TG)43.4%、ジグリセリド(DG)14.9%、モノグリセリド(MG)0.2%、脂肪酸(FA)41.4%、水分量620ppmを含んでいた。従って、1gの高酸価油には、0.414gの脂肪酸が含まれていることになる。固定化リパーゼとしては、ムコール・ミーハイ(含水量8

.2%)をマクロポーラスな弱塩基性陰イオン交換樹脂に結合されたリボザイムIN20(ノボ社製)を使用した。前記高酸価米糠油1g下記表1に示すようにグリセリン(G)添加量を高酸価油からトリグリセリドを生成するための化学量論量の0~4倍の間で変化させて配合して成る各種基質の失々に、リボザイム0.05gを添加して成るものを、キャップをしない試験管に失々入れ、これらを60℃で24時間振とうする蒸発乾燥法で脱水し乍らトリグリセリドの合成を行った。

前記24時間後の失々の生産物の組成を、3連のShodex GPC KF-802を装着し、HPLCにて分析した後、重量比に換算する標準曲線から求めた。その結果を下記表1に示す。

表1

グリセリン添加量(g) 脂肪酸に対する割合(%)	0	5	10	20	30	40	生産物の組成
							TG (%) DG (%) MG (%) FA (%) TG/DG TG/FA
	0	0.021	0.041	0.082	0.123	0.161	49.0 10.1 0.0 40.9 4.85 1.20
		60.4 16.3 0.1 23.2	87.2 25.7 0.3 6.8	50.5 45.7 2.3 1.5	38.6 55.1 6.0 0.3	32.3 58.0 9.5 0.3	2.61 9.88 33.87 128.67 0.70 107.67

表中の遊離脂肪酸含量に対して、10%のグリセリンの添加量は、用いた高酸価油からトリグリセリドを合成するための化学量論量にあっている。この化学量論量は、次のように計算した。

トリグリセリドを合成するための化学量論量  $g = 92 \times 1/3$  [(高酸価油のケン化物中の脂肪酸のモル数) - (高酸価油のケン化物中のジグリセリドのモル数) - 2 (高酸価油のケン化物中のモノグリセリドのモル数) - 3 (高酸価油中のグリセリンのモル数)] ... (3)

上記表1から明らかなように、高酸価油から脂肪酸を減少させる一方、トリグリセリドの合成を得るためには、化学量論量のグリセリンの添加により最も有効であったが、化学量論量の半分或いはその2倍までは、その目的を達成することができた。

上記表1及び後記する実施例2から明らかなように、反応中モノグリセリドの合成は殆どなかったこと、該実施例2で明らかにするように、

特開平4-183396(7)

脱水速度と同等しい速度で脂肪酸が減少していることより、固定化リパーゼによるトリグリセリド合成は、脂肪酸とグリセリンが反応してジグリセリドが生成される第1反応と、ジグリセリドと脂肪酸よりトリグリセリドが生成される第2反応によって進行していると考えられる。TGを合成する化学量論量のグリセリンは、上記の(3)式で計算されるから、例えば化学量論量を用いた系内での未反応グリセリン量は、下記式(4)で計算できることになり、この値を用いると、前記の第1反応式(1)は、グリセリンの変化量から評価でき、前記の第2反応式(2)はTGの変化量から評価することができる。

グリセリンの化学量論量を用いた場合の反応系(混合物)中のグリセリンのモル数 =  $1/3$   
(脂肪酸のモル数 - ジグリセリドのモル数 - 2モノグリセリドのモル数) ... (4)

実施例2

高酸価油として、TG44.8%、DG18.9%、MG0.6%、FA35.8%、水分量1640ppmを含む高酸価

の米糠油15gとトリグリセリド合成のための化学量論量であるグリセリン0.44gとから成る基質に、含水量8.4%のリボザイムIM60(ノボ社製)0.75gを添加して調整した原料を、3本の試験管A、B、Cにとり、60℃で反応させると同時に、乾燥窒素を通気量を失わず吹き込み、脱水処理を行った。その反応過程で、水分濃度と生産物の組成分析を行った。その結果を下記表2に示す。

表2

時間 (分)	水分 (ppm)	$10^3 \Delta W / \Delta t$ (%/時間)	$10^3 \Delta TG / \Delta t$ (%/時間)	$10^3 \Delta FA / \Delta t$ (%/時間)
0-1	1640	-0.017	-0.716	-0.885
1-3	558	0.035	-0.548	-0.569
3-5	140	0.068	-0.159	-0.182
5-7	52	0.049	-0.054	-0.055
0-1	1640	-0.026	-0.435	-0.569
1-3	668	-0.010	-0.313	-0.319
3-5	559	0.058	-0.213	-0.222
5-7	258	0.071	-0.195	-0.199
0-1	1640	-0.058	-0.308	-0.347
1-3	1333	-0.048	-0.358	-0.361
3-5	1208	0.048	-0.195	-0.222
5-7	583	0.045	-0.168	-0.181

表2において、平均水分濃度 $\bar{W}$ とは、任意の時間 $t_1$ 及び $t_2$ ( $t_2 > t_1$ )の時の水分濃度を $W_{t_1}$ 、 $W_{t_2}$ とすると、 $\bar{W} = (W_{t_1} + W_{t_2}) / 2$ である。反応液25g中の時間 $t_1$ 、 $t_2$ の時のトリグリセリドの重量%を $10^3 \cdot TG / t_1$ 、 $10^3 \cdot TG / t_2$ とすると、トリグリセリドの生成速度 $\Delta TG / \Delta t$ (モル/時間)は、 $\Delta TG / \Delta t = 25 (TG_{t_2} - TG_{t_1}) / (t_2 - t_1)$ である。866とは、高酸価油のトリグリセリドの平均分子量である。高酸価油中の脂肪酸の分子量を276とすると、脂肪酸の減少速度 $\Delta FA / \Delta t$ (モル/時間)は、 $\Delta FA / \Delta t = 25 (FA_{t_2} - FA_{t_1}) / (t_2 - t_1)$ である。水分の減少速度を評価するには、トリグリセリド合成される際の減水量も評価しなければならないので、 $\Delta W / \Delta t = 25 \{ (W_{t_2} - W_{t_1}) / (10000 \times 18) + (FA_{t_2} - FA_{t_1}) / 276 \} / (t_2 - t_1)$ となる。

前記のA、B、Cのサンプルについて、通気量を異にして反応させたその反応過程での脱水速度 $\Delta W / \Delta t$ と脂肪酸減少速度 $\Delta FA / \Delta t$ の関係を調



特開平4-183396(8)

べるべく、縦軸に脱水速度を横軸に脂肪酸減少速度をとり、A、B、Cのサンプルより夫々脱水速度と脂肪酸減少速度をプロット(図中、○、△、□で示す)と実験で示すように、原点を通る直線を示し、 $\Delta W / \Delta t = K \Delta F / \Delta t$ という関係式に整理することができた。点線はK1の値である。該実験のKを求めるとK=1.15となっていた。

このように、通気量の変化に関係なく、両者は上記の関係式の関係にあることが判った。

従って、脱水速度を脂肪酸減少速度より大きくすることが、固定リパーゼによるトリグリセリドの合成に必要であることが判った。

第2図は、上記の脱水速度が脂肪酸減少速度より15%多い、即ちK=1.15を保ち乍ら、前記の試験管Aのサンプルを該固定リパーゼによる接触反応と乾燥装置を吹き込むことによる脱水処理を同時に行うことを45時間続けたときの該高酸価油の各成分の経時的変化を示す。時間の経過に従い、トリグリセリドの合成量が増大し、水分濃度10 ppm以下の超微水系においても

増加を続け、80%を超え90%近くにも達する反面、脂肪酸は減少を続け殆ど0に近付き、極めて優れた生産物、即ち高酸価油の精製品が得られた。ジグリセリドは、反応開始直後一旦上昇したが、その後は経時的に減少した。モノグリセリドは、殆ど生産されなかった。

次に、固定化リパーゼの初期水分含有量並に基質の初期水分濃度が脂肪酸の減少並にトリグリセリドの増加にどのように影響するかを検討した実施例につき説明する。

実施例3

リボザイム1H60について、含水量の異なる3種類を用意した。即ち、1つは、ビンから出したまま乾燥処理しないもの(含水量8.2%)、他の2つは、五酸化リンと共にデシケーターに入れ、モレキュラーシーブカラムのトラップの付いた配管を通じて一晚乾燥したもの(含水量2.5%)及び7日間乾燥したもの(含水量1.24%)を用意した。その含水量は、重量変化値から算出した。

該基質は、TG58.2%、DG13.2%、MG0.6%、脂肪酸27.9%、水分濃度405ppmから成る高酸価米糠油とその含有脂肪酸に対し、前記の化学抽出量のグリセリンを配合したものである。該基質について含水量の異なる2種類を用意した。即ち、これに水飽和させて7770 ppm、7176 ppmの水分を夫々含ませた2種類の wet状態のもの及び一晚60℃で真空脱水して夫々89 ppm、63 ppm、92 ppmの水分濃度とした3種類の dry状態のものを用意した。

これら各種の固定化リパーゼと基質とを下記表3のように組合わせて、反応開始時の水分量を変化させ、その夫々の原料を試験管に容れ、密栓すると共に真空装置に接続し、夫々の原料を60℃に加熱反応させると共に、5~10mmHgに減圧し乍ら反応と脱水処理を同時に行い、反応時間1時間及び8時間の時点で生産物の組成を分析した。その結果は、下記表3に示す通りであった。

表3

固定化リパーゼ中の水分量	基質中の水分濃度(ppm)	反応時間(hr)	生産物の組成の経時的変化			脂肪酸の減少		
			トリグリセリド(%)	ジグリセリド(%)	モノグリセリド(%)	脂肪酸(%)	脂肪酸(%)	脂肪酸(%)
8.2%	89	1	57.0	22.7	0.6	19.7	19.7	19.7
		8	70.2	17.2	0.1	12.4	12.4	12.4
	7770	1	55.0	27.4	0.5	16.2	16.2	16.2
		8	70.4	19.4	0.1	10.1	10.1	10.1
2.5%	63	1	58.0	24.5	0.5	15.9	15.9	15.9
		8	71.5	17.9	0.1	10.4	10.4	10.4
	7176	1	58.8	20.9	0.6	15.7	15.7	15.7
		8	70.3	21.9	0.2	7.6	7.6	7.6
1.24%	92	1	54.7	20.5	2.5	21.4	21.4	21.4
		8	62.0	19.1	1.7	17.1	17.1	17.1

特開平4-183396(9)

上記表から明らかなように、固定化リパーゼとして1.24%に乾燥したものを使用した場合は、トリグリセリドの合成が比較的高く、又、脂肪酸の減少量が少なく良くなかった。

固定化リパーゼとして含水量2.5%の乾燥状態のもの、水分濃度83 ppmの乾燥状態の高質を組合わせた場合は、トリグリセリドの合成が最も高かった。又、含水量2.5%の乾燥固定化リパーゼと水を飽和した7776 ppm含む高質を組合わせた場合は、脂肪酸の減少量が最も大きかった。

乾燥しない固定化リパーゼを乾燥高質及び水飽和(7770 ppm)高質と夫々組合わせた場合も良い結果を得た。

冒頭に述べたバタチャリア等の報告では、リボザイムは10%の水分が必要であるとしているが、上記のように10%以下の含水量8.2%の固定化リパーゼ、或いは更にこれを乾燥した水分の少ない乾燥リパーゼを使用が、むしろ、脂肪酸の減少効果及びトリグリセリドの増大効果に

において優れていることが判った。多くの試験研究の結果、好ましい固定化リパーゼの含水量は8.2~1.3%の範囲であり、好ましい高質の水分濃度は、約50~8000 ppmの範囲の範囲であり、これらを色々に組合わせて使用することである。尚、高質の水分測定は、電量方式微量水分測定装置CA-03(三菱化成製)で行った。

本法を連続的に実施する高酸価油の精製装置としては、次のような精製装置が好ましい。即ち、固定化リパーゼを内蔵した固定床リアクターと脱水装置とを各別に設けると共に、これらをループ状に連結して成る精製装置を使用することが好ましい。かくして、該装置を使用すれば、高質を循環させ接触反応条件と脱水条件とを各別に調整し得るようにし、高酸価油の種類、品質、その他の状況の変化に応じて、脱水速度が脂肪酸の減少速度よりも大きい値を所望に調節し得るようにすることができ好ましい。

下記にその2種類の精製装置を使用して本法を実施する例を示す。

実施例4

第3図示の高酸価油の精製装置を使用して本法を実施する例を説明する。

図面で1は、固定床リアクターを示し、該リアクター1には固定化リパーゼ2として1.25gのリボザイムIN60(含水量8.2%)を充填したものである。3は、キャップをしない上面を開放したエバポレーション式脱水装置を示す。該脱水装置3は、脱水槽3aと加熱攪拌器3bとから成る。4は恒温槽、5は循環用ポンプ、6は温度計を示し、該固定床リアクター1、該脱水槽3a、該恒温槽4、該ポンプ5を接続パイプ7でループ状に連結して成る。

該装置を運転するには、該固定床リアクター1の外周のジャケットに温水を通して反応温度を60℃に保ち、原料として、実施例1に使用したと同じ脱ガム、脱ロウした高酸価の米糠油25gとグリセリン0.9gとから成る高質を該循環ポンプ5に連なる供給口(図示しない)より導入し、該ポンプ5を介して5ml/分の速さ

で矢示のように循環せしめるが、該固定床リアクター1を通し、その間に60℃で固定化リパーゼ2との接触反応を行わせ、その反応液を該脱水槽3a内に送給し、該脱水槽3a内で該反応液8を該加熱攪拌器3bにより70℃に保ち乍ら、蒸発脱水処理を行った後、該恒温槽4内で該脱水槽3aを出たパイプ7内の脱水された反応液は、該恒温槽4内で60℃に保たれ、再び該固定床リアクター1内に入り、接触反応を受け、爾後同様にして接触反応と蒸発脱水処理を繰り返した。

かくして、脱水速度と脂肪酸減少速度との関係は、 $K=1.012$ を保持せしめた。その結果、24時間後の生成物中のトリグリセリドの含量は60%以上となり、遊離脂肪酸の含量は15%以下となった。又水分濃度は450ppm以下であった。24時間後、新たに同様の高質を外部から供給して、同様にループ状に循環させて連続運転を行った。脱水槽3a内の反応液の温度を70℃に保つときは、10日間連続運転しても、上記の良好な生産物が得られ、又、該リパーゼの失活は見ら

れず、反応中のロウ分析出による活性低下は見られなかった。

#### 実施例 5

実施例 1 に用いたと同じ組成と水分量から成る高酸価な米糠油 1 g とグリセリン 0.036 g とから成る蒸質にリボザイム IN60 を 0.05 g 添加し、良く混合して成る原料を試験管にとり、その夫々の試験管を密栓すると共に排気管を介して真空装置に接続し、その夫々の試験管内を吸引排気して試験管内の酸素濃度を大気中の約 0.6% に保ちながら、夫々 55℃ 及び 60℃ に加熱して反応と減圧脱水を行った。K を実施例 2 の如く計算すると、 $K=1.008$  以上となった。即ち、上記のような減圧下での反応と脱水処理を行うときは、下記表 4 に示すように、トリグリセリドの収率が著しく高く且つ脂肪酸の残量が著しく低く、極めて良質の生産物が得られ、又、加熱温度が 55℃ よりも 60℃ の方がトリグリセリドの収率が良い結果を得た。

表 4

反応温度	試験管 A 試験			試験管 B 試験		
	55℃			60℃		
反応時間	3時間	6時間	24時間	3時間	6時間	24時間
水分濃度	210ppm	132ppm	93ppm	183ppm	125ppm	59ppm
生産物組成						
トリグリセリド (%)	45.3	53.3	78.2	51.3	61.8	83.6
モノグリセリド (%)	37.3	34.4	14.9	32.9	28.5	13.7
二グリセリド (%)	0.5	0.1	—	0.2	0.1	—
脂肪酸	16.9	12.2	5.9	15.6	9.6	5.9

#### 実施例 6

第 4 図示の装置を使用し、本法を実施する例を説明する。

内部に、固定化リパーゼ 2 としてリボザイム IN60 を 1.25 g 充填した固定床リアクター 1 は、バブリング式脱水装置 9 と接続パイプによりループ 7 状に連結され反応系路を形成し、反応系路内に循環用ポンプ 5 を介在させて、反応液を矢示のように循環せしめるようにした。10 はニードル弁、11 は蒸質の入口、12 は生産物の排出口を示す。脱水装置 9 は、接続パイプから成るループ状脱水系路 13 と接続し、脱水系路 13 に、筒内にモレキュラーシープ 5A を 250 g 充填して成るモレキュラーシープカラム 14 と循環用エアポンプ 15 とを介在せしめると共に、外部の重炭酸などの不活性ガス供給源例えば重炭酸ポンプなどに連なる。16 は、脱水系路 13 と不活性ガス供給源との間に介在せしめた供給弁、17 はフローメーターを示す。該装置を使用し、高酸価な米糠油の精製を行うには、例えば、高酸価な米糠油 (TG43.4%、DG14.9%、NG 0.2%、FA41.4%、水分量 620ppm) 25 g とグリセリン 0.55 g とを混合して成る蒸質を、該蒸質入口 11 より導入し、該循環用ポンプ 5 を駆動して矢示のように毎分 6 ml の速度で循環せしめる。該リアクター 1 を通過するとき、該リパーゼにより接触反応し、その反応液は、脱水装置 9 内に上方から入り、滴下して下端から抜くようにした。一方、該循環用エアポンプ 15 を作動して不活性ガス供給源、例えば重炭酸ポンプよりの、例えば、重炭酸ガスを該弁 16 を介して矢示のように脱水系路 13 内を循環せしめる。然るときは、該重炭酸ガスは該モレキュラーシープカラム 14 を通過し、乾燥重炭酸ガスとなって脱水装置 9 の下部より吹き込み上方に抜けるように循環する。かくして、該乾燥重炭酸ガスを反応液 8 と 60℃ で接触させバブリングにより脱水処理を行った。該バブリングによる発泡は、吹き込み口の口径を調整し、且つ脱水装置 9 の上部に仕切板を設けて泡の果散を防いだ。

油 (TG43.4%、DG14.9%、NG 0.2%、FA41.4%、水分量 620ppm) 25 g とグリセリン 0.55 g とを混合して成る蒸質を、該蒸質入口 11 より導入し、該循環用ポンプ 5 を駆動して矢示のように毎分 6 ml の速度で循環せしめる。該リアクター 1 を通過するとき、該リパーゼにより接触反応し、その反応液は、脱水装置 9 内に上方から入り、滴下して下端から抜くようにした。一方、該循環用エアポンプ 15 を作動して不活性ガス供給源、例えば重炭酸ポンプよりの、例えば、重炭酸ガスを該弁 16 を介して矢示のように脱水系路 13 内を循環せしめる。然るときは、該重炭酸ガスは該モレキュラーシープカラム 14 を通過し、乾燥重炭酸ガスとなって脱水装置 9 の下部より吹き込み上方に抜けるように循環する。かくして、該乾燥重炭酸ガスを反応液 8 と 60℃ で接触させバブリングにより脱水処理を行った。該バブリングによる発泡は、吹き込み口の口径を調整し、且つ脱水装置 9 の上部に仕切板を設けて泡の果散を防いだ。

このように、該循環ポンプ5による反応液の循環による該リアクター1内での接触反応の繰り返しと該循環エアポンプ15による乾燥不活性ガスによる該反応液のバブリング脱水処理の繰り返しを所望時間行つた。

この場合、該脱水速度を該脂肪酸脱水速度との関係を、 $K=1.017$ とした、而して所望時間経過後、該蒸発入口11より新たに蒸気を供給し、1、2分窒素ガスを通気して窒素飽和にした後、窒素の供給を止め、連続精製作業を長期間に亘り行つた。その結果は下記表5に示す通りである。モレキュラーシーブカラムは、所望期間を置いて、電気炉で加熱し再生する。該表に明らかなように、運転日数2日目には、トリグリセリドは85.0%、脂肪酸 0.8%の優れた生産物が得られた。又、反応開始後20日程度までは、トリグリセリドは70%以上、脂肪酸は10%以下の品質が極めて良い生産物が得られていたが、その後トリグリセリドの収率が徐々に低下し始め、それと共に残存脂肪酸含量が徐々に増大してき

た。

そこで、運転31日目に有機溶剤、例えば、ヘキサン50mlを該反応系路10内に注入し、固定化リパーゼの細孔内の付着物を洗浄除去した後、前記と同様に運転を再開すると、僅か乍らトリグリセリドの収率が増大し、残存脂肪酸も減少した。これは、付着物の除去により、固定化リパーゼの活性が回復したからであると解される。

次に、運転35日目に、還元剤として 6.7%のマニトールを30mlのグリシン-NaOH緩衝液 (pH 10.5) に加えた還元剤を、該反応系路10内に加え、48時間循環後、運転を再開すると、トリグリセリドの収率が更に増大し、残存脂肪酸も減少した。又、運転36日目に、30mlの水に17500単位のスーパーオキシジスムターゼを添加して成る液で24時間循環し、更に30mlのグリシン-NaOH緩衝液 (pH10.5) にアスコルビン酸 6.7%を加えて成る液で24時間循環後、運転を再開するとトリグリセリドの収率が更に向上した。これは、長期間の運転中に反応系路内の酵素によ

り生産物の過酸化物質が増大し、固定化リパーゼも過酸化されていたものを、該還元剤で還元したため、該リパーゼの活性が上昇したものと解される。

表5

運転日数	反応後の水分 ppm	生産物の組成			
		Triglyceride %	FFA %	Cholesterol %	Fatty acid %
2日	103	85.0	14.0	0.2	0.8
5日	86	81.0	13.5	0.1	5.4
12日	104	75.2	17.6	0.3	6.8
17日	83	69.8	20.3	0.1	9.7
21日	123	65.8	22.0	0.3	11.9
30日	138	53.8	18.2	2.5	25.7
31日	177	54.0	16.3	2.2	27.5
32日	101	54.8	17.1	4.5	23.5
35日	93	56.4	15.0	3.0	25.6
36日	96	57.2	14.0	2.8	26.4

## 実施例7

実施例6と同様に運転する過程で、24時間毎のサンプリング時に、該弁16を開けて、該窒素ポンペより窒素ガスを3〜4分脱水系路13内に飽和させた後、開弁し続け、該脱水系路13及び反応系路10内を降圧に保ち、運転を再開した。その結果は下記表6に示す通りであった。

表6

測定日数 (日)	反応後の過酸化物質 (11含量/%)	生産物の組成			
		トランス脂肪酸 %	脂肪酸 %	脂肪酸 %	脂肪酸 %
1	21.3	73.4	16.7	0.2	9.7
4	20.2	76.2	14.5	0.1	9.1
5	15.0	76.4	14.2	-	9.4
8	15.5	75.4	14.9	0.7	9.0
11	15.8	75.8	15.7	0.4	8.0

特開平4-183396(13)

を添加すれば、長期に亘る連続生産が可能となる。

更に、本法を実施するに当たり、固定化リパーゼを内蔵した固定化リアクターと脱水装置とを各別に設け、且つこれらをループ状に連結すれば、その接触反応条件と脱水条件とを各別に調整し得るようにすれば、脱水速度を脂肪酸減少速度より大きい値を所望に応じ調整できる便利をもたらす。

更に、精製装置として、該脱水装置を、エバポレーション式脱水装置とし、80℃以上で反応液の加熱蒸発処理を行い、該リアクターでの反応温度を50～70℃の範囲とするときは、目的とする高酸価油の優れた精製品が得られる。又、別の精製装置として、該固定床リアクターとバブリング式脱水装置とをループ状とした反応系と、不活性ガス供給源に連なるモレキュラーシーブカラムと該バブリング式脱水装置を含むループ状とした脱水系とを組合わせ、該リアクターでの反応温度を50～70℃とし、反応液を

60℃以上の乾燥不活性ガスでバブリング脱水処理を行うようにすることにより、目的とする高酸価油の優れた精製品が得られる。

更に、本発明によれば、通時、溶剤を循環するときは、固定化リパーゼの洗浄が行われ、その活性を向上できる効果を有する。又、通時、還元剤を循環するときは、固定化リパーゼの過酸化物質の上昇の防止、活性化をもたらす。

又、バッチ式やループ式の反応系内を不活性ガスで降圧とし、或いは酸素濃度を大気圧の1.5%以下とした真空減圧下で、反応、脱水処理を行うときは、固定化リパーゼの過酸化物質の向上を防止し、その活性の向上、トリグリセリドの生産性の向上などをもたらす。

#### 4 図面の簡単な説明

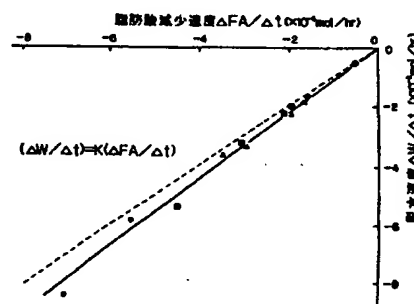
第1図は、本発明方法の実施の1例における脱水速度と脂肪酸減少速度との関係を示すグラフ、第2図は、本発明の実施の1例における高酸価油の組成成分の経時的変化を示すグラフ、第3図は、本法の実施に使用する1例の精製装置

の概図、第4図は、本法の実施に使用する他例の精製装置の概図を示す。

- 1…固定床リアクター    2…固定化リパーゼ
- 3…エバポレーション式脱水装置
- 5…循環用ポンプ        7…ループ
- 8…反応液
- 9…バブリング式脱水装置
- 10…反応系            13…脱水系
- 15…循環用エアポンプ

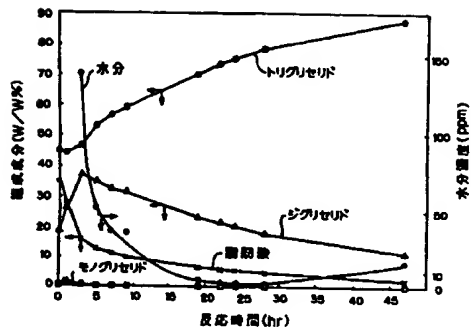
特許出願人      工業技術院長 杉浦 賢  
 同              ボーソー油脂株式会社  
 復代理人、代理人 北 村 和 男

第1図

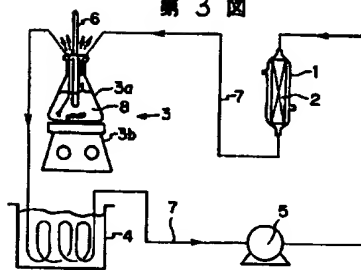


特開平4-183396(14)

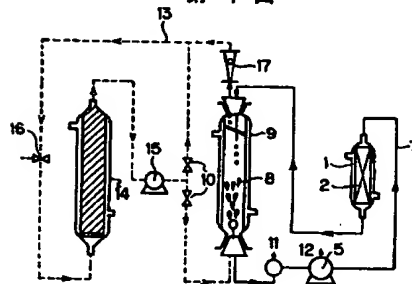
第2図



第3図



第4図



第1頁の続き

②発明者 東 直 輝 千葉県船橋市日の出2丁目17番1号 ポーソー油脂株式会社内